

УДК 581.1

ВЛИЯНИЕ ОБРАБОТКИ СЕМЯН САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТОЙ НА РОСТ, АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ И СОДЕРЖАНИЕ ПРОЛИНА В ЛИСТЯХ ПШЕНИЦЫ ПРИ ИЗБЫТОЧНОМ УРОВНЕ ЦИНКА ВО ВНЕШНЕЙ СРЕДЕ

© 2024 г. А. А. Игнатенко^{а, *}, И. А. Нилова^а, Н. М. Казнина^а, А. Ф. Титов^а

^аИнститут биологии — обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра “Карельский научный центр Российской академии наук”, Петрозаводск, Россия

*e-mail: angelina911@ya.ru

Поступила в редакцию 23.05.2024 г.

После доработки 31.05.2024 г.

Принята к публикации 03.06.2024 г.

Исследовали влияние обработки семян салициловой кислотой (СК, 100 мкМ) на прорастание семян, рост, уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) и функционирование ряда компонентов антиоксидантной системы у растений пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Злата, выращиваемых при оптимальном (2 мкМ) или избыточном (1500 мкМ) содержании цинка в корнеобитаемой среде. Показано, что избыток цинка оказывает ингибирующее действие на рост корня и побега, а также усиливает накопление одного из индикаторов развития ПОЛ — малонового диальдегида (МДА). При этом структурная целостность мембран сохранялась, на что указывает отсутствие изменения проницаемости мембран, регистрируемое по выходу электролитов. Активность антиоксидантных ферментов — супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы (КАТ) — в этих условиях не изменялась, а активность гваякол-специфичной пероксидазы (ГвПО) снижалась. Обработка семян СК в концентрации 100 мкМ, стимулирующей их прорастание, усиливала отрицательное воздействие избытка цинка в отношении показателей роста и накопления МДА в листьях пшеницы. Однако и в этом случае выход электролитов не увеличивался, что, предположительно, связано с возрастанием активности СОД и ГвПО. На основании представленных в работе и полученных ранее данных, а также анализа литературы, сделан вывод, что реакция растений на избыток цинка во внешней среде, подобно реакции на другие абиотические стрессы, является не только многокомпонентной и многофакторной, но и вариативной, зависящей от многих факторов и обстоятельств — дозы воздействия (концентрации цинка и продолжительности его действия), биологических особенностей вида (сорта) растений, их возрастного состояния и т.д. Обработка семян СК может изменять характер реакции растений на действие избытка цинка, при этом направленность этих изменений будет, в свою очередь, зависеть от концентрации СК, продолжительности ее действия и способа обработки.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., антиоксидантные ферменты, избыток цинка, обработка семян, пролин, рост, салициловая кислота, тяжелые металлы

DOI: 10.31857/S0015330324060085, EDN: MANDHZ

ВВЕДЕНИЕ

Цинк является одним из наиболее важных микроэлементов для роста и развития растений. Он входит в структуру или является кофактором большого числа ферментов, участвует в белковом, углеводном и липидном обмене, метаболизме ДНК и РНК, синтезе хлорофиллов и фитогормонов [1, 2]. Помимо этого, цинк

необходим для поддержания целостности клеточных мембран, он может выступать в роли вторичного мессенджера, а также влиять на активность и фолдинг белков [3–5]. Однако в высоких концентрациях, которые достаточно часто возникают во внешней среде в результате антропогенной деятельности, он токсичен для растений. Известно, в частности, что избыток цинка оказывает отрицательное воздействие на ростовые процессы, фотосинтетическую активность, водный обмен и минеральное питание растений, что в конечном итоге снижает их про-

Сокращения: ГвПО — гваякол-специфичная пероксидаза; КАТ — каталаза; СК — салициловая кислота; СОД — супероксиддисмутаза; ТБК — тиобарбитуровая кислота.

дуктивность [5–8]. Поэтому важной и актуальной задачей является поиск способов повышения устойчивости растений к действию высоких концентраций цинка во внешней среде. Особую актуальность подобные исследования приобретают в отношении ведущих сельскохозяйственных культур, к которым относится пшеница, чьи посевные площади только в России по данным Росстата [9] составили в 2023 г. более 29 млн га.

К числу наиболее эффективных и экологически безопасных способов повышения устойчивости растений к действию тяжелых металлов относят обработку семян или побегов фитогормонами [10]. Согласно данным, имеющимся в литературе, экзогенное применение фитогормонов индуцирует запуск широкого спектра физиологических, биохимических и молекулярных реакций, которые обеспечивают не только выживание растений, но и их способность успешно произрастать в условиях действия достаточно высоких концентраций тяжелых металлов [10]. С этой точки зрения особый интерес представляет многофункциональное соединение фенольной природы – салициловая кислота (СК). Ее роль в регуляции различных физиологических процессов, таких как прорастание семян, вегетативный рост, движение устьиц, цветение, фотосинтез, термогенез, а также реакции растений на действие стресс-факторов, хорошо известна [6, 11, 12]. Отмечено, что одним из первых стресс-факторов абиотической природы, в отношении которого была установлена защитная роль СК, были тяжелые металлы [12]. В частности, получены данные, указывающие на участие СК в повышении устойчивости растений к действию кадмия, меди, свинца, ртути, никеля, хрома и цинка [7, 8, 10, 12–14]. В отношении цинка показана эффективность применения СК с целью снижения его отрицательного влияния на прорастание семян [2], рост растений и биосинтез хлорофилла [6, 13, 14], ее положительное влияние на активность антиоксидантных ферментов [15], экспрессию кодирующих их генов [8], содержание глутатиона [15], сахаров [8], крахмала [16], элементов минерального питания [6] и баланс других фитогормонов [2]. Кроме того, выявлены заметные различия по степени накопления цинка в корнях и побегах растений, которые обрабатывались или не обрабатывались СК [2, 6, 8, 16].

Как известно, важную роль в неспецифических защитных реакциях растений на действие тяжелых металлов, включая цинк, играет активизация компонентов антиоксидантной системы. В единичных работах имеются сведения о влиянии СК на окислительно-восстановительный баланс в клетках, что вносит существенный вклад в формирование устойчивости растений к действию высоких концентраций цинка [7, 8,

15, 16]. Защитную роль СК, прежде всего, связывают с ее способностью снижать содержание активных форм кислорода (АФК) и соединений, образующихся в результате реакций окисления липидов [7, 8], в том числе за счет повышения уровня низкомолекулярных протекторных соединений и активности антиоксидантных ферментов [15, 16]. Высказано также предположение, что СК может поддерживать активность антиоксидантных ферментов на более высоком уровне, препятствуя возможному связыванию ионов цинка с активными центрами некоторых ферментов, например, с активным центром Cu , Zn -супероксиддисмутазы [7].

Цель работы – изучение влияния обработки семян СК на растения пшеницы, подвергнутые воздействию избытка цинка в корнеобитаемой среде.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили растения мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) ярового сорта Злата, семена которой были предоставлены ФГБНУ “Федеральный исследовательский центр “Немчиновка”. После стерилизации 5% гипохлоритом натрия их проращивали в чашках Петри в темноте в течение 3 сут. При этом одну часть семян проращивали на дистиллированной воде (вариант “СК 0”), а другую – в течение 1 сут. выдерживали на растворе СК, затем отмывали от него и продолжали проращивать на дистиллированной воде (вариант “СК 100”). Проклюнувшиеся семена высаживали в пластиковые контейнеры (1.4 л), содержащие питательный раствор Хогланда-Арнона с оптимальным (2 мкМ, pH 5.7) или избыточным (1500 мкМ, pH 5.7) содержанием цинка – варианты “Zn 2” и “Zn 1500”, соответственно. Цинк вносили в форме его сернокислой соли ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Растения выращивали в течение 11 сут. в камере искусственного климата при температуре воздуха 22°C, относительной влажности 60–70%, ФАР 180 мкмоль/(м²·с) и фотопериоде 14 ч. Все измерения проводили на втором листе.

Оптимальная концентрация СК (100 мкМ) была подобрана на основании специальных опытов, в которых семена пшеницы замачивали на 24 ч в растворах СК с разной концентрацией (от 1 до 700 мкМ). После этого семена отмывали от СК и продолжали проращивать на дистиллированной воде. О реакции растений на СК судили по энергии прорастания и всхожести от начала проращивания согласно [17], а также по изменению линейных размеров корня, его сырой и сухой биомассы. Концентрация цинка (1500 мкМ) выбрана на основании предварительных опытов, позволивших рассматривать ее в качестве сублетальной для растений пшеницы.

Энергию прорастания и всхожесть семян определяли согласно [17], подсчитывая количество нормально проросших и всхожих семян на 3 и 7 сут. от начала проращивания, соответственно. Показатели энергии прорастания и всхожести семян рассчитывали в процентах к общему числу высеванных семян.

Линейные размеры корней и побегов измеряли общепринятым способом. Площадь листа определяли по формуле:

$$S = 2/3 \times l \times d, \text{ где:}$$

l — длина листовой пластинки;

d — ширина листовой пластинки [18].

Проницаемость мембран клеток определяли по выходу электролитов из высечек листьев с использованием кондуктометрического метода [19]. Для этого растительный материал (300 мг) тщательно промывали в дистиллированной воде для удаления клеточного сока со срезов, высушивали с помощью фильтровальной бумаги и помещали в колбы с 30 мл дистиллированной воды. Колбы ставили на шейкер S-4, SkyLine (“ELMI”, Латвия) на 4 ч и затем оценивали выход электролитов по изменению электропроводности с использованием кондуктометра (“HANNA”, Италия). После этого колбы инкубировали на водяной бане при 95°C в течение 20 мин, затем быстро охлаждали, доводили объем в колбах до исходной величины и помещали их на шейкер на 20 мин. Полный выход электролитов определяли по электропроводности вытяжки после разрушения мембран кипячением. Результирующий выход электролитов рассчитывали в процентах от полного выхода, при этом из полученных значений вычитали электропроводность дистиллированной воды.

Интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали по накоплению малонового диальдегида (МДА), содержание которого определяли по цветной реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК). Растительный материал (100 мг) гомогенизировали в 2 мл 20% охлажденного раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ), помещали в холодильник на 10 мин, затем центрифугировали в течение 15 мин при 10000 g и температуре 4°C. Из полученного гомогената отбирали 700 мкл с помощью дозатора (“Экрос-Аналитика”, Россия), добавляли к ним 1300 мкл 0.5% ТБК в 20% ТХУ и 50 мкл 2% тритона X-100. Использовали дополнительный контроль (без ТБК), в который вместо смеси 0.5% ТБК в 20% ТХУ добавляли 1300 мкл 20% ТХУ. Реакционную смесь инкубировали на водяной бане при 95°C в течение 30 мин, затем быстро охлаждали и центрифугировали в течение 15 мин при 10000 g и температуре 4°C. Оптическую плотность супернатанта измеряли с помощью спектрофотометра (“Спектр”,

Россия) при 532, 600 и 440 нм. Содержание МДА рассчитывали по формуле [20], используя коэффициент экстинкции, равный 155 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Для определения активности супероксиддисмутазы (СОД, КФ 1.15.1.1), каталазы (КАТ, КФ 1.11.1.6) и гваякол-специфичной пероксидазы (ГвПО, 1.11.1.7) растительный материал (100 мг) гомогенизировали в 2 мл буфера (pH 7.5), который включал 50 мМ HEPES, 5 мМ MgCl_2 , 0.4 мМ ЭДТА, 3 мМ ДТТ, 1 мМ PMSF, 1% PVP, 10% глицерол. Гомогенат центрифугировали в течение 20 мин при 14000 g и температуре 4°C. Полученный супернатант использовали для определения активности ферментов и содержания белка с помощью спектрофотометра СФ-2000 (“Спектр”, Россия). Общую активность СОД определяли по способности фермента ингибировать фотохимическое восстановление нитросинего тетразолия до формазана согласно методу [21] с модификацией [22]. Оптическую плотность раствора измеряли при 560 нм. Активность КАТ определяли по ферментативному разложению пероксида водорода при 240 нм [23]. Активность ГвПО оценивали по увеличению оптической плотности при 470 нм в результате окисления гваякола в присутствии пероксида водорода [24]. Общее содержание белка анализировали согласно [25], используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин.

Содержание свободного пролина анализировали методом Бейтса с соавт. [26]. Растительный материал (500 мг) гомогенизировали в 10 мл 3% сульфосалициловой кислоты, затем центрифугировали в течение 10 мин при 5100 g и температуре 4°C. К 2 мл супернатанта добавляли 2 мл ледяной уксусной кислоты и 2 мл нингидринового реактива. Для приготовления последнего смешивали нингидрин, 6М ортофосфорную кислоту и ледяную уксусную кислоту. Полученную смесь инкубировали на водяной бане при 95°C в течение 60 мин, затем быстро охлаждали и определяли оптическую плотность с помощью спектрофотометра (“Спектр”, Россия) при 520 нм. Содержание пролина определяли по калибровочной кривой, используя стандартный раствор химически чистого L-пролина (“Вектон”, Россия).

В работе представлены средние значения по трем независимым опытам и их стандартные ошибки. В каждом опыте ростовые показатели изучали на выборке, представленной 12 растениями. При изучении биохимических показателей биологическая повторность, представляющая собой смешанную пробу 2–3 растений, была 3–5-кратная, аналитическая — 3-кратная. Статистическую обработку данных осуществляли общепринятыми методами с использованием пакета программ Microsoft Office Excel 2007 и PAST 4.0. Статистически значимыми считали различия при $P \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Концентрация СК (100 мкМ), использованная нами в основной части исследования, была выбрана на основании серии специальных опытов, которые показали, что в концентрациях от 1 до 700 мкМ она не оказывает ощутимого влияния на всхожесть и энергию прорастания семян пшеницы (табл. 1). Что касается роста корней, то СК в концентрациях 1–100 мкМ или не влияла на их рост, или слегка стимулировала этот процесс, а ее более высокие концентрации оказывали на него небольшое ингибирующее воздействие (табл. 1).

В следующей серии опытов было изучено влияние цинка в концентрации 1500 мкМ на ряд физиологических и биохимических показателей у растений пшеницы, а также оценен эффект обработки семян СК на ответную реакцию растений на избыток цинка. Опыты показали, что у растений пшеницы, семена которых не подвергались обработке СК (СК 0), избыток цинка вызывал значительное торможение роста. В частности, длина корня, размер побега и площадь листа у растений в этом варианте

опыта (Zn 1500) были, соответственно, на 40, 32 и 48% меньше, чем в варианте с оптимальным содержанием цинка (Zn 2) (табл. 2). У растений, семена которых предварительно обрабатывались СК (СК 100), в условиях оптимального минерального питания не отмечено значимых изменений изученных ростовых показателей по сравнению с вариантом СК 0, тогда как в варианте с избыточным содержанием цинка обработка СК несколько усиливала отрицательный эффект данного металла на рост корней и побегов (табл. 2).

Важно отметить, что независимо от концентрации цинка в корнеобитаемой среде (Zn 2 или Zn 1500), в вариантах с обработкой семян СК или без нее нарушения проницаемости клеточных мембран в листьях растений не происходило, о чем свидетельствуют данные о выходе электролитов (рис. 1а). Тем не менее под влиянием избытка цинка в листьях растений возрастало содержание МДА как в варианте без обработки СК (СК 0), так и после обработки ею семян (СК 100), причем во втором случае в большей степени (рис. 1б).

Таблица 1. Влияние разных концентраций СК на энергию прорастания, всхожесть семян, размер корня и его биомассу у растений пшеницы в оптимальных условиях роста

Концентрация СК, мкМ	Энергия прорастания, %	Всхожесть семян, %	Длина корня, см		Биомасса корня, мг	
			3 сут.	7 сут.	сырая	сухая
0 (без СК)	92 ± 0.85 ^a	92 ± 1.44 ^a	5.68 ± 0.06 ^b	13.97 ± 0.30 ^b	57.57 ± 2.93 ^{bc}	5.92 ± 0.32 ^{bc}
1	93 ± 1.35 ^{ab}	95 ± 1.49 ^a	5.80 ± 0.05 ^b	14.16 ± 0.29 ^{ab}	63.43 ± 2.81 ^{ab}	6.35 ± 0.36 ^{ab}
10	95 ± 1.04 ^{ab}	94 ± 1.03 ^a	5.98 ± 0.05 ^a	14.79 ± 0.28 ^a	67.36 ± 2.90 ^a	6.89 ± 0.31 ^a
100	96 ± 0.87 ^b	94 ± 0.63 ^a	6.06 ± 0.06 ^a	14.65 ± 0.29 ^{ab}	66.43 ± 3.12 ^a	6.57 ± 0.39 ^{ab}
300	95 ± 1.44 ^{ab}	94 ± 1.19 ^a	5.65 ± 0.06 ^b	14.03 ± 0.29 ^{ab}	57.96 ± 2.71 ^{bc}	5.49 ± 0.28 ^{cd}
500	96 ± 1.58 ^{ab}	94 ± 1.49 ^a	5.46 ± 0.06 ^c	13.88 ± 0.27 ^b	51.23 ± 2.47 ^c	4.46 ± 0.25 ^d
700	93 ± 0.75 ^{ab}	92 ± 1.03 ^a	5.06 ± 0.06 ^d	13.62 ± 0.26 ^b	51.14 ± 2.53 ^c	4.64 ± 0.35 ^d

Примечание: разными латинскими буквами отмечены статистически значимые различия между вариантами, в которых использовались разные концентрации СК, при $P \leq 0.05$. На третьи сутки оценивали энергию прорастания и измеряли длину корня, на седьмые сутки — всхожесть семян, длину корня, его сырую и сухую биомассу.

Таблица 2. Размеры корня и побега у растений пшеницы, выращенных из необработанных и обработанных СК семян, при оптимальном или избыточном содержании цинка в корнеобитаемой среде

Показатель	Zn 2		Zn 1500	
	СК 0	СК 100	СК 0	СК 100
Длина корня, см	13.53 ± 0.25 ^a	14.00 ± 0.30 ^a	8.13 ± 0.24 ^b	6.36 ± 0.13 ^c
Высота побега, см	32.30 ± 0.57 ^a	32.27 ± 0.55 ^a	21.87 ± 0.62 ^b	19.30 ± 0.43 ^c
Площадь второго листа, см ²	7.92 ± 0.26 ^a	7.67 ± 0.21 ^a	4.10 ± 0.23 ^b	3.21 ± 0.18 ^c

Примечание: Zn 2 — растения выращивали при оптимальном содержании цинка (2 мкМ); Zn 1500 — растения выращивали при избыточном содержании цинка (1500 мкМ); СК 0 — семена не обрабатывались раствором СК; СК 100 — семена в течение 1 сут. обрабатывались раствором СК (100 мкМ). Разными латинскими буквами отмечены статистически значимые различия между средними величинами при $P \leq 0.05$.

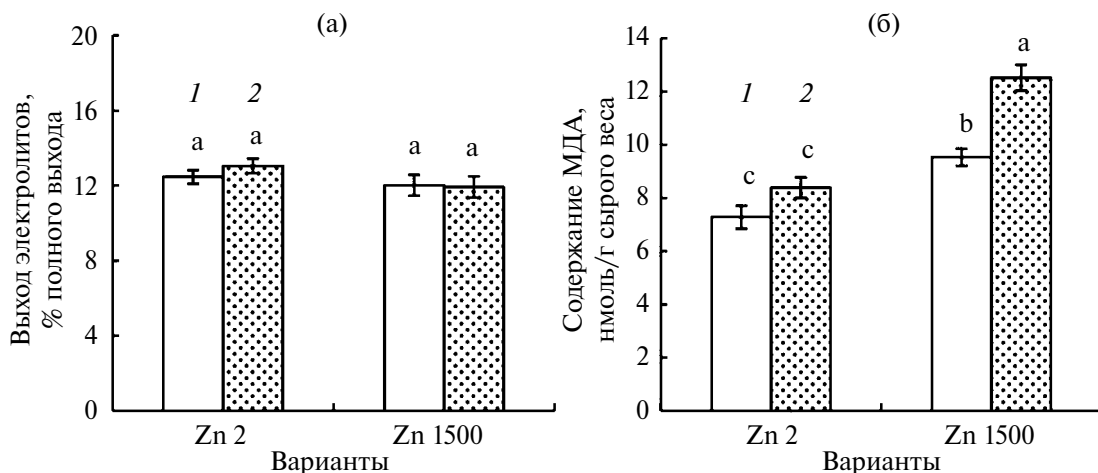


Рис. 1. Выход электролитов (а) и содержание МДА (б) у растений пшеницы, выращенных из необработанных и обработанных СК семян, при оптимальном или избыточном содержании цинка в корнеобитаемой среде. Zn 2 – растения выращивали при оптимальном содержании цинка (2 мкМ); Zn 1500 – растения выращивали при избыточном содержании цинка (1500 мкМ); 1 – семена не обрабатывались раствором СК; 2 – семена в течение 1 сут. обрабатывались раствором СК (100 мкМ). Разными латинскими буквами отмечены статистически значимые различия между средними величинами при $P \leq 0.05$.

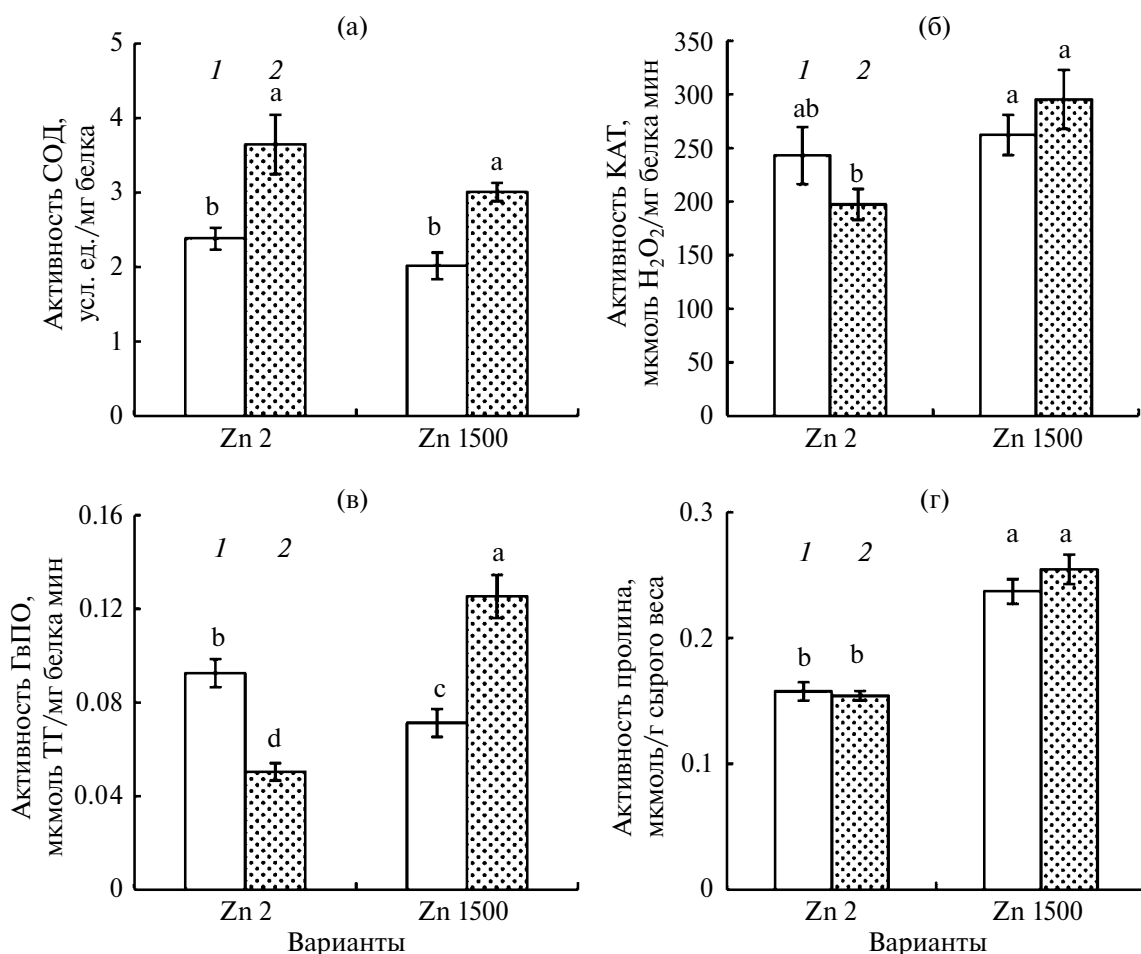


Рис. 2. Активность СОД (а), КАТ (б), ГвПО (в) и содержание пролина (г) у растений пшеницы, выращенных из необработанных и обработанных СК семян, при оптимальном или избыточном содержании цинка в корнеобитаемой среде. Zn 2 – растения выращивали при оптимальном содержании цинка (2 мкМ); Zn 1500 – растения выращивали при избыточном содержании цинка (1500 мкМ); 1 – семена не обрабатывались раствором СК; 2 – семена в течение 1 сут. обрабатывались раствором СК (100 мкМ); ТГ – тетрагваякол. Разными латинскими буквами отмечены статистически значимые различия между средними величинами при $P \leq 0.05$.

Анализ активности антиоксидантных ферментов показал, что под влиянием избытка цинка (Zn 1500) у растений, семена которых не подвергались обработке СК, активность СОД (рис. 2а) и КАТ (рис. 2б) в листьях сохранялась на уровне растений, выращиваемых при оптимальном содержании цинка (Zn 2), а активность ГвПО (рис. 2в) оказалась ниже в 1.3 раза по сравнению с таковой в варианте Zn 2. После обработки семян СК (СК 100) у растений в оптимальных условиях минерального питания (Zn 2) активность СОД (рис. 2а) возрастала в 1.5 раза, активность ГвПО (рис. 2в), наоборот, снижалась в 1.8 раза по сравнению с вариантом без обработки СК, а активность КАТ (рис. 2б) не изменялась. В варианте с избытком цинка обработка семян СК также приводила к увеличению в листьях растений активности СОД в 1.5 раза (рис. 2а) и ГвПО – в 1.8 раза по сравнению с вариантом без обработки (рис. 2в) при отсутствии изменений в активности КАТ (рис. 2б).

Наряду с антиоксидантными ферментами в защите клеток от окислительного стресса активно участвуют неферментные компоненты, такие как пролин. В наших опытах под влиянием избытка цинка (Zn 1500) его содержание в листьях пшеницы заметно возрастало (в 1.5 раза по сравнению с вариантом Zn 2), причем как после обработки семян СК, так и без нее (рис. 2г).

ОБСУЖДЕНИЕ

Повышение содержания цинка в окружающей среде, вызванное антропогенной деятельностью или иными причинами, как правило, приводит к изменению и/или нарушению хода многих (если не всех) физиолого-биохимических процессов у растений, одним из ранних проявлений которого является торможение их роста [7, 8, 27]. В наших опытах воздействие избытка цинка (1500 мкМ) также оказывало выраженный негативный эффект на рост пшеницы, который прежде всего проявлялся в отношении корней, что было ожидаемо, поскольку именно они контактируют с ионами цинка, находящимися в корнеобитаемой зоне, и накапливают их в наибольших количествах. Торможение роста растений в подобных условиях могло быть обусловлено целым рядом причин. Например, избыток цинка способен вызывать у растений остановку митотического деления клеток [1], повреждение клеточных мембран [16], снижение скорости фотосинтеза [8, 28], а также может приводить к нарушению поглощения элементов минерального питания [6].

Как известно, важную роль в регуляции ростовых процессов, в том числе и при воздействии на растения тяжелых металлов, играют фитогормоны. Под их контролем находятся не

только деление и растяжение клеток, лежащие в основе роста и морфогенеза, но и связанные с ними (напрямую или опосредованно) многие другие физиолого-биохимические процессы [29]. В отношении СК и ее производных показано, что при действии тяжелых металлов, включая цинк, они, применяемые в определенных концентрациях, могут способствовать увеличению линейных размеров и/или накоплению биомассы растений [7, 13, 16]. Так, например, обработка семян СК в концентрации 50 [13] или 100 мкМ [7] поддерживала на более высоком уровне рост побега или корня растений пшеницы в условиях избытка цинка. Обработка растений с помощью опрыскивания с использованием более высоких концентраций СК (500 и 1000 мкМ) оказывала положительный эффект на рост шалфея и люцерны, который проявлялся в увеличении размеров надземной и подземной части растений или в усилении накопления их сырой биомассы при высоком содержании цинка во внешней среде [6, 8]. Предполагается, что стимулирующее влияние СК на ростовые процессы в условиях действия на растения тяжелых металлов может быть связано с увеличением поглощения ими элементов минерального питания, необходимых для роста [6], поддержанием гормонального баланса [30] и/или увеличением интенсивности фотосинтеза [13]. Повышение скорости последнего при избыточном (1500 мкМ) содержании цинка в субстрате, коррелирующее с поддержанием в листьях более высокого содержания фотосинтетических пигментов и устойчивой проводимости, обнаружено нами у растений пшеницы, семена которых предварительно обрабатывались СК (100 мкМ) [28]. Однако, что касается стимулирующего эффекта СК на рост пшеницы, в настоящем исследовании он зафиксирован только на начальных стадиях роста растений пшеницы и при их выращивании в темноте. При этом в условиях избытка цинка в корнеобитаемой зоне обработка семян СК, напротив, несколько усиливала ингибирующее действие избытка цинка на рост побега и корня растений. Отметим, что в литературе имеются сведения о том, что данное фенольное соединение не всегда оказывает на ростовые процессы только стимулирующий эффект. Его проявление может быть опосредованно влиянием СК на транспорт и распределение ауксина [31], эксудацию органических кислот из корней в ризосферу [32] или на окислительно-восстановительный баланс [33]. Наблюдаемые различия в характере реакции на обработку семян СК, фиксируемые по ростовым показателям, могут объясняться наличием видовых (и сортовых) особенностей, условиями выращивания растений, фазой развития, на которой анализируется ответная реакция растения на действие избытка

цинка, интенсивностью (концентрацией цинка) и продолжительностью его воздействия, а также условиями обработки растений СК (способ обработки и ее длительность, концентрация СК).

По своей химической характеристике цинк не является редокс-активным металлом, однако его избыточное накопление в клетках может приводить к развитию окислительного стресса, вызванного усилением образования АФК [7]. Результатом окислительного стресса является окисление биологических молекул, в частности, липидов, которое сопровождается накоплением одного из его конечных продуктов – МДА. Увеличение содержания МДА в клетках растений при избытке цинка отмечалось ранее в других работах [13, 16, 34] и в наших опытах. Важно подчеркнуть, что в присутствии концентрации цинка 1500 мкМ уровень МДА в наибольшей степени повышался у тех растений пшеницы, семена которых подвергались обработке СК. Об увеличении содержания АФК и/или ТБК-активных продуктов под влиянием СК ранее сообщали другие авторы [11, 30, 33]. Проявление подобного эффекта СК связывают с ингибированием транспорта электронов в ЭТЦ митохондрий и окислительного фосфорилирования, усилением высвобождения цитохрома *c* из митохондрий, увеличением активности мембранной НАДФН-оксидазы, снижением активности КАТ [35]. При этом накопление АФК и продуктов деградации мембранных липидов, с одной стороны, может приводить к нарушению ультраструктуры клеточных органелл (в частности, митохондрий) и сопровождаться торможением роста растений [33]. С другой стороны, окисление липидов, а именно полиненасыщенных жирных кислот, приводит к образованию (ферментативным или неферментативным путем) оксилипинов, вовлеченных не только в регуляцию процессов роста и развития, но и защитных реакций растений, в частности, на действие тяжелых металлов [36]. Что касается СК, образующиеся радикалы и продукты перекисного окисления липидов рассматриваются в качестве важных посредников, участвующих в сигнальных путях этого фитогормона [11]. В пользу этого свидетельствует то, что ингибирование генерации АФК и ряда других эффектов, наблюдаемое при обработке пшеницы СК, увеличивает восприимчивость растений к ионам кадмия [30]. При этом транзиторное увеличение интенсивности окислительного стресса под влиянием СК может служить своего рода сигналом, необходимым, в том числе, для активизации работы антиоксидантной системы, во многом обеспечивающей повышение устойчивости растений к внешним факторам [11].

Действительно, есть сведения о том, что в условиях избытка цинка применение СК (обработка семян, опрыскивание растений или выращивание на растворе с добавлением СК) вы-

зывало в растениях повышение активности СОД, КАТ, ферментов аскорбат-глутатионового цикла и экспрессии кодирующих их генов [8, 15, 16], а также индуцировало увеличение содержания глутатиона [8], аскорбата [15], хлорофиллов [6], флавоноидов, пролина и сахаров [16]. В наших опытах при избытке цинка в корнеобитаемой среде обнаружено повышение активности СОД и ГвПО, причем только у тех растений, семена которых были обработаны СК. При этом обращает на себя внимание существенное повышение в этих условиях активности ГвПО. Пероксидаза является одним из наиболее полифункциональных ферментов, а гваяколовой пероксидазе помимо детоксикации АФК отводят важную роль в биосинтезе лигнина [37]. Его отложение в клеточных стенках не только придает тканям механическую прочность, но и может замедлять (или даже подавлять) транспорт тяжелых металлов в ксилему и их перемещение в надземную часть растений [38]. При этом повышение активности лигнифицирующих пероксидаз напрямую коррелирует с увеличением содержания лигнина в тканях, что обнаружено, например, у растений клевера [37], ромашки [39] и пшеницы [30]. О возможности участия в регуляции этих процессов СК также упоминается в литературе [30, 39]. С этой точки зрения, интерес представляют данные о повышении уровня МДА при избытке цинка в тканях растений пшеницы, семена которых обрабатывались СК. Как известно, окислительная полимеризация монолигнолов (один из этапов биосинтеза лигнина) происходит в присутствии АФК, и накопление лигнина усиливается наряду с увеличением содержания МДА [37, 39]. На фоне этого у растений наблюдается торможение ростовых процессов, что может объясняться лигнификацией, которая уменьшает пластичность клеточной стенки и ограничивает рост клеток [37]. Поэтому нельзя исключить, что отмеченное нами накопление МДА и рост активности гваяколовой пероксидазы у растений пшеницы, семена которых обрабатывались СК, и, как следствие, торможение роста взаимосвязаны и могут объясняться усилением биосинтеза лигнина и увеличением его содержания. О взаимосвязи этих процессов у растений, а также участии в их регуляции СК свидетельствуют также данные, полученные Shakirova с соавт. [30].

Наряду с антиоксидантными ферментами в стабилизации клеточных мембран, в том числе и благодаря своим антиоксидантным свойствам, участвует свободный пролин. Он также способен выступать в роли хелатора, образующего нетоксичные металл-пролиновые комплексы с рядом металлов [40]. Его накопление в клетках растений при избытке цинка отмечалось ранее в других работах [8, 16] и в наших опытах. Что же касается эффекта СК на содержание пролина, то

в наших опытах он не был зафиксирован. Вполне вероятно, что в этом случае для поддержания жизнеспособности растений, испытывающих действие избытка цинка, достаточно было активизации под влиянием СК ряда антиоксидантных ферментов и, возможно, усиления биосинтеза каких-то других низкомолекулярных соединений, содержание которых в данной работе не определялось.

Все перечисленные выше факты и их анализ приводит нас к выводу о многообразии (и разнообразии) защитно-приспособительных реакций и защитных механизмов, которыми располагают растения и благодаря которым они способны выживать в условиях стресса, в частности, вызванного действием на них тяжелых металлов. СК как один из элементов гормональной системы способна включаться в эти события и вносить свой вклад в общую картину наблюдаемых в растениях изменений в обмене веществ под влиянием стресса (рис. 3). При этом важно подчеркнуть, что характер ответной реакции растений на действие избытка цинка под влиянием СК может изменяться по-разному в зависимости от конкретного показателя. В данной и предыдущей работе [28] нами в совокупности было изучено 14 показателей, значения шести из которых под влиянием обработки семян СК возрастали (интенсивность фотосинтеза, активность СОД и ГвПО, содержание хлорофиллов и каротиноидов, содержание МДА), четырех

других снижались (длина корня, высота побега, площадь второго листа, активность карбоангидразы), а четырех — не изменялись (выход электролитов, устьичная проводимость, содержание пролина, активность КАТ).

Очевидно, что расширение набора изучаемых показателей приведет к увеличению перечня показателей в каждой из трех указанных выше групп. Это служит аргументом того, что реакция растений на стресс является не только многокомпонентной и многоэшелонной, но и весьма вариативной, зависящей от многих факторов и обстоятельств — силы (интенсивности) и продолжительности стресса, сопутствующих стрессу внешних факторов (температура, влажность, освещенность и др.), биологических особенностей вида (сорта) растений, их возрастного состояния и т.д. Следовательно, логично ожидать, что характер реакции растений, семена которых были подвергнуты обработке СК, на избыток цинка во внешней среде может варьировать как количественно, так и качественно в зависимости от указанных выше факторов, а также в зависимости от концентрации СК, продолжительности ее действия и способа введения в растения. Именно это находит свое подтверждение в работах авторов, исследования которых посвящены данному вопросу.

Наконец, следует сказать, что реальная картина происходящих под влиянием СК изменений в растениях, находящихся в условиях избытка



Рис. 3. Влияние обработки семян СК (100 мМ) на характер ответной реакции растений пшеницы на действие избытка цинка (1500 мкМ) в корнеобитаемой среде.

ка цинка во внешней среде, является еще более сложной, т.к. здесь мы не обсуждаем вовлеченность в защитно-приспособительные реакции растений других гормонов, участие генетической системы и вклад структурных (ультраструктурных) изменений. Но без ее всестороннего изучения и более глубокого понимания невозможна разработка эффективных методов и способов повышения устойчивости и продуктивности растений, культивируемых в разных агроклиматических условиях.

Авторы выражают благодарность руководителю лаборатории аналитической Института леса КарНЦ РАН к.б.н. Никеровой К.М. за методическую помощь, и.о. зав. лабораторией селекции и первичного семеноводства озимой пшеницы ФГБНУ “Федеральный исследовательский центр “Немчиновка” к.с.-х.н. Мамедову Р.З. за семенной материал для исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке государственного задания FMEN-2022-0004 на научном оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра “Карельского научного центра Российской академии наук”.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jain R., Srivastava S., Solomon S., Shrivastava A.K., Chandra A. Impact of excess zinc on growth parameters, cell division, nutrient accumulation, photosynthetic pigments and oxidative stress of sugarcane (*Saccharum* spp.) // *Acta Physiol. Plant.* 2010. V. 32. P. 979. <https://doi.org/10.1007/s11738-010-0487-9>
2. Huang Y.T., Cai S.Y., Ruan X.L., Chen S.Y., Mei G.F., Ruan G.H., Cao D.D. Salicylic acid enhances sunflower seed germination under Zn^{2+} stress via involvement in Zn^{2+} metabolic balance and phytohormone interaction // *Sci. Horti.* 2021. V. 275. Art. 109702. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109702>
3. Sharma A., Soares C., Sousa B., Martins M., Kumar V., Shahzad B., Singh Sidhu G.-P., Bali A.S., Asgher M., Bhardwaj R., Kumar Thukral A.K., Fidalgo F., Zheng B. Nitric oxide-mediated regulation of oxidative stress in plants under metal stress: a review on molecular and biochemical aspects // *Physiol. Plant.* 2020. V. 168. P. 318. <https://doi.org/10.1111/ppl.13004>
4. Liu B., Yu H., Yang Q., Ding L., Sun F., Qu J., Feng W., Yang Q., Li W., Fu F. Zinc Transporter ZmLAZ1-4 modulates zinc homeostasis on plasma and vacuolar membrane in maize // *Front. Plant Sci.* 2022. V. 13. Art. 881055. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.881055>
5. Wang Y., Kang Y., Yu W., Lyi S.M., Choi H.W., Xiao E., Li L., Klessig D.F., Liu J. AtTIP2;2 facilitates resistance to zinc toxicity via promoting zinc immobilization in the root and limiting root-to-shoot zinc translocation in *Arabidopsis thaliana* // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2022. V. 233. Art. 113333. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113333>
6. Es-sbihi F.Z., Hazzoumi Z., Joutei K.A. Effect of salicylic acid foliar application on growth, glandular hairs and essential oil yield in *Salvia officinalis* L. grown under zinc stress // *Chem. Biol. Tech. Agril.* 2020. V. 7. Art. 26. <https://doi.org/10.1186/s40538-020-00192-6>
7. Mazumder M.K., Sharma P., Moulick D., Tata K.S., Choudhury S. Salicylic acid ameliorates zinc and chromium-induced stress responses in wheat seedlings: a biochemical and computational analysis // *Cereal Res. Commun.* 2022. V. 50. P. 407. <https://doi.org/10.1007/s42976-021-00201-w>
8. Li Q., Guan C., Zhao Y., Duan X., Yang Z., Zhu J. Salicylic acid alleviates Zn-induced inhibition of growth via enhancing antioxidant system and glutathione metabolism in alfalfa // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2023. V. 265. Art. 115500. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.115500>
9. Кулистикова Т. Росстат: посевная площадь оказалась меньше прошлогодней; <https://www.agroinvestor.ru/markets/news/40784-rosstat-posevnaya-ploshchad-okazalas-menshe-proshlogodney>
10. Rahman S.U., Li Y., Hussain S., Hussain B., Khan W.-D., Riaz L., Ashraf M.N., Khaliq M.A., Du Z., Cheng H. Role of phytohormones in heavy metal tolerance in plants: a review // *Ecol. Indicat.* 2023. V. 146. Art. 109844. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2022.109844>
11. Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. Формирование адаптивных реакций растений на действие абиотических стрессоров. К.: Основа, 2010. 352 с.
12. Janda T., Szalai G., Pál M. Salicylic acid signalling in plants // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. Art. 2655. <https://doi.org/10.3390/ijms21072655>
13. Гильванова И.Р., Еникеев А.Р., Степанов С.Ю., Рахманкулова З.Ф. Участие салициловой кислоты и оксида азота в защитных реакциях растений пшеницы при действии тяжелых металлов // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2012. Т. 48. С. 103.
14. Stanislawska-Glubiak E., Korzeniowska J. Effect of salicylic acid foliar application on two wheat cultivars grown under zinc stress // *Agronomy.* 2022. V. 121. Art. 60. <https://doi.org/10.3390/agronomy12010060>
15. Namdjoyan S., Kermanian H., Soorki A.A., Tabatabaei S.M., Elyasi N. Interactive effects of salicylic acid and nitric oxide in alleviating zinc toxicity of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) // *Ecotoxicol.* 2017. V. 26. P. 752. <https://doi.org/10.1007/s10646-017-1806-3>

16. *Taherbahrani S., Zoufan P., Zargar B.* Modulation of the toxic effects of zinc oxide nanoparticles by exogenous salicylic acid pretreatment in *Chenopodium murale* L. // *Env. Sci. Poll. Res.* 2021. V. 28. Art. 65644. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-15566-y>
17. ГОСТ 12038-84. Межгосударственный стандарт. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести. Дата введения: 1986-07-01. М.: Изд-во стандартов.
18. *Аникиев В.В., Кутузов Ф.Ф.* Новый способ определения площади листовой поверхности у злаков // *Физиология растений.* 1961. Т. 8. С. 375.
19. *Грищенко Н.Н., Лукаткин А.С.* Определение устойчивости растительных тканей к абиотическим стрессам с использованием кондуктометрического метода // *Поволж. экол. журн.* 2005. Т. 1. С. 3.
20. *López-Hidalgo C., Meijón M., Lamelas L., Valledor L.* The rainbow protocol: A sequential method for quantifying pigments, sugars, free amino acids, phenolics, flavonoids and MDA from a small amount of sample // *Plant Cell Environ.* 2021. V. 4. P. 1977. <https://doi.org/10.1111/pce.14007>
21. *Beauchamp Ch., Fridovich I.* Superoxide dismutase improved assays and an assay applicable to acrylamide gels // *Anal. Biochem.* 1971. V. 44. P. 276.
22. *Ershova M.A., Nikerova K.M., Galibina N.A., Sofronova I.N., Borodina M.N.* Some minor characteristics of spectrophotometric determination of antioxidant system and phenolic metabolism enzyme activity in wood plant tissues of *Pinus sylvestris* L. // *Protein Pept. Lett.* 2022. V. 9. P. 711. <https://doi.org/10.2174/0929866529666220414104747>
23. *Aebi H.* Catalase in vitro // *Methods in Enzymol.* 1984. V. 105. P. 121.
24. *Maehly A.C., Chance B.* The assay of catalase and peroxidase // *Meth. Biochem. Anal.* 1954. V. 1. P. 357. <https://doi.org/10.1002/9780470110171.ch14>
25. *Bradford M.M.* A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
26. *Bates L.S., Waldeen R.P., Teare I.D.* Rapid determination of free proline for water stress studies // *Plant Soil.* 1973. V. 39. P. 205. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>
27. *Титов А.Ф., Казнина Н.М., Таланова В.В.* Тяжелые металлы и растения. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2014. 194 с.
28. *Игнатенко А.А., Нилова И.А., Холопцева Е.С., Титов А.Ф., Казнина Н.М.* Влияние обработки салициловой кислотой на фотосинтетический аппарат и активность карбоангидразы у пшеницы при избытке цинка // *Докл. РАН. Науки о жизни.* 2023. Т. 513. С. 570. <https://doi.org/10.31857/S2686738923700415>
29. *Чумикина Л.В., Арапова Л.И., Колпакова В.В., Топунов А.Ф.* Фитогормоны и абиотические стрессы (обзор) // *Химия раст. сырья.* 2021. Т. 4. С. 5. <https://doi.org/10.14258/jcprm.2021049196>
30. *Shakirova F.M., Bezrukova M.V., Maslennikova D.R.* Endogenous ABA as a hormonal intermediate in the salicylic acid induced protection of wheat plants against toxic ions // *Salicylic acid* / Eds. Hayat S., Ahmad A., Alyemeni M. Springer, Dordrecht. 2013. P. 119. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6428-6_7
31. *Tan S., Abas M., Verstraeten I., Glanc M., Molnar G., Hajny J., Lasak P., Petrík I., Russinova E., Petrasek J., Russinova E., Petrasek J., Novak O., Pospisil J., Friml J.* Salicylic acid targets protein phosphatase 2A to attenuate growth in plants // *Curr. Biol.* 2020. V. 30. P. 381. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.11.058>
32. *Yang Z.M., Wang J., Wang S.H., Xu L.L.* Salicylic acid-induced aluminum tolerance by modulation of citrate efflux from roots of *Cassia tora* L. // *Planta.* 2003. V. 217. P. 168. <https://doi.org/10.1007/s00425-003-0980-0>
33. *Дмитриева С.А., Пономарева А.А., Минибеева Ф.В., Гордон Л.Х.* АФК и протон-опосредованное действие салициловой кислоты на рост и ультраструктуру клеток корней пшеницы // *Учен. зап. Казан. гос. ун-та. Сер. Естеств. науки.* 2008. Т. 150. С. 123.
34. *Seregin I.V., Ivanova T.V., Voronkov A.S., Kozhevnikova A.D., Schat H.* Zinc- and nickel-induced changes in fatty acid profiles in the zinc hyperaccumulator *Arabidopsis halleri* and non-accumulator *Arabidopsis lyrata* // *Plant Physiol. Biochem.* 2023. V. 197. Art. 107640. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.107640>
35. *Poor P.* Effects of salicylic acid on the metabolism of mitochondrial reactive oxygen species in plants // *Biomolecules.* 2020. V. 10. Art. 341. <https://doi.org/10.3390/biom10020341>
36. *Савченко Т.А., Застрижная О.М., Климов В.В.* Оксипилены и устойчивость растений к абиотическим стрессам // *Биохимия.* 2014. Т. 79. С. 458. <https://doi.org/10.1134/S0006297914040051>
37. *Lee B.-R., Kim K.-Y., Jung W.-J., Avice J.-C., Ourry A., Kim T.-H.* Peroxidases and lignification in relation to the intensity of water-deficit stress in white clover (*Trifolium repens* L.) // *J. Exp. Bot.* 2007. V. 58. P. 1271. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl280>
38. *Liu Q., Luo L., Zheng L.* Lignins: biosynthesis and biological functions in plants // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19. P. 335. <https://doi.org/10.3390/ijms19020335>
39. *Kovacik J., Gruz J., Backor M., Strnad M., Repcak M.* Salicylic acid-induced changes to growth and phenolic metabolism in *Matricaria chamomilla* plants // *Plant Cell Rep.* 2009. V. 28. P. 135. <https://doi.org/10.1007/s00299-008-0627-5>
40. *Тарчевский И.А., Егорова А.М.* Участие пролина в адаптации растений к действию стресс-факторов и его использование в агробиотехнологии (обзор) // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2022. Т. 58. С. 315.